



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 154**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/72** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02713068 .1**  
96 Fecha de presentación : **10.04.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1381869**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54 Título: **Análisis de hemoglobina.**

30 Prioridad: **24.04.2001 GB 0110053**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2008**

73 Titular/es: **AXIS-SHIELD ASA**  
**Ulvenveien 87**  
**0510 Oslo, NO**

72 Inventor/es: **Holtlund, Jostein;**  
**Bernström, Kerstin;**  
**Dworsky, Ellen y**  
**Corneliussen, Lise**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 309 154 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Análisis de hemoglobina.

5 Esta invención se refiere a mejoras en métodos de ensayo para hemoglobina glicatada y en relación con ellos.

Las proteínas en solución en los fluidos corporales están sometidas continuamente a procesos de glicosilación. La glucosa reacciona con las proteínas por reacciones no enzimáticas para formar glicoproteínas, y en muchos casos el nivel de formación de glicoproteína es proporcional a la concentración de glucosa en el fluido corporal en cuestión.  
10 Para proteínas no inicialmente sintetizadas como glicoproteínas, la fracción de una proteína presente en forma glicatada es, por tanto, una función del tiempo de vida de la proteína en el organismo y las concentraciones de glucosa a las que ha sido expuesta la proteína.

A diferencia de las medidas de concentraciones de glucosa en sangre, plasma u orina, que solamente dan información acerca de la concentración de glucosa en el momento de la toma de muestra, la cantidad de una proteína presente en forma glicosilada da indicación del control de concentración de glucosa del organismo a lo largo de periodos de tiempo más prolongados.  
15

Los eritrocitos (células rojas de la sangre) tienen un tiempo de vida medio de aproximadamente 120 días y contienen grandes cantidades de hemoglobina. La fracción de hemoglobina de eritrocitos en forma glicosilada es, por tanto, una buena medida de control de la enfermedad en pacientes con *diabetes mellitus*, y es una función de las concentraciones de glucosa en la sangre del paciente en las semanas anteriores a la toma de muestras.  
20

En la Patente estadounidense US-A-5242842 (Axis) se ha propuesto un ensayo de hemoglobina glicosilada que emplea como reactivo marcado con un informador un conjugado de ácido borónico, por ejemplo, un conjugado de éster de N-(resorufina-4-carbonil)piperidina-4-ácido carboxílico-N-hidroxi-succinimida (RESOS) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) con ácido aminofenilborónico. El componente aniónico  $B(OH)_3^-$  del reactivo se une a los grupos cis-diol de la hemoglobina glicosilada para marcar la hemoglobina glicosilada con el marcador informador (por ejemplo RESOS o FITC).  
25

En la Patente estadounidense US-A-5631364 (Axis) se describe un grupo de conjugados de ácido borónico marcados por un informador particularmente eficaz, que incluye el conjugado xileno-cianol-ácido fenilborónico citado allí como XC-DAPOL-CPBA. El marcador cromóforo da a este conjugado una absorción máxima de 616 nm (es decir, es de color azul) y la proporción de hemoglobina en una muestra que está glicosilada puede determinarse midiendo la absorbancia de la muestra a 616 nm y a 415 nm, donde la hemoglobina tiene un máximo de absorción.  
30  
35

Un ensayo diagnóstico para hemoglobina glicatada (es decir, glicosilada) utilizando este sistema está disponible comercialmente de Axis Shield Plc como el ensayo NycoCard<sup>®</sup> HbA1c. Para llevar a cabo este ensayo, se mezcla una solución acuosa ligeramente alcalina de reactivo con una muestra de sangre y la mezcla se aplica a una membrana porosa que se enjuaga antes de determinar la reflectancia luminosa por la membrana (es decir por la hemoglobina atrapada en la membrana). La solución de reactivo comprende un agente tensioactivo (para la lisis de los eritrocitos y liberar la hemoglobina), XC-DAPOL-CPBA para unirse a hemoglobina glicatada e iones zinc para precipitar la hemoglobina. La hemoglobina precipitada, tanto la glicatada como la no glicatada, es captada por la membrana mientras que otras proteínas glicatadas y el exceso de conjugado de ácido borónico se eliminan por lavado desde la membrana en la etapa de enjuagado.  
40  
45

Los resultados de este ensayo, sin embargo, pueden variar con el tiempo de almacenado del reactivo, llegando a ser no fiables si se almacenan durante aproximadamente 6 meses o más. Dado que un laboratorio clínico puede tener equipos (kits) de ensayo de distintas edades, existe la necesidad de aumentar la precisión reproducible de un ensayo de hemoglobina glicatada basado en conjugado de ácido borónico.  
50

Los autores de la presente invención han encontrado ahora que la fiabilidad de tales ensayos se puede mejorar si están presentes el conjugado de ácido borónico y el zinc en reactivos separados en el kit de ensayo. Según esto, un aspecto de la invención proporciona un kit para ensayo de hemoglobina glicatada, comprendiendo el citado kit:  
55

una membrana porosa capaz de retener la hemoglobina precipitada;

un primer reactivo que comprende iones de zinc en solución acuosa básica o que comprende un compuesto hidrosoluble de zinc;  
60

un segundo reactivo que comprende un conjugado de cromóforo-ácido borónico; y

opcionalmente, un reactivo acuoso de lavado;

65 donde al menos uno de los reactivos primero y segundo comprende además un compuesto tensioactivo capaz de lisar eritrocitos, y donde el citado segundo reactivo, si es líquido, es ácido.

## ES 2 309 154 T3

El segundo reactivo del kit de la invención puede ser una solución, o puede ser un material seco o sin disolvente. Este reactivo comprende preferiblemente al menos parte del compuesto tensioactivo. El disolvente, cuando el reactivo es líquido, puede ser agua o disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo un alcohol, éter, cetona, amida, sulfóxido, etc., o una mezcla de dos o más de ellos. Los ejemplos de disolventes preferidos son agua, metanol, DMSO y formamida. El reactivo incluye preferiblemente un ácido (por ejemplo ácido cítrico) y, preferiblemente tiene un pH por debajo de 6, más preferiblemente por debajo de 5, si es líquido. Si el reactivo es seco o libre de disolvente, es especialmente preferido que se prepare por desecado de una solución para la que el disolvente es agua, metanol, o metanol y agua (preferiblemente hasta 70% en volumen de metanol, por ejemplo al menos 20%, por ejemplo 30 a 70%). La utilización de agua como disolvente es la especialmente preferida. Se ha encontrado, sorprendentemente, que secando una solución tal que contenga el conjugado de ácido borónico y compuesto tensioactivo, por ejemplo por evaporación, queda un residuo oleoso que se disuelve en agua más rápidamente que el conjugado o el compuesto tensioactivo solos. Además, cuando se utiliza un sistema metanol/agua, se encuentra que el residuo es capaz de dar un recubrimiento más uniforme a una superficie que en el caso de metanol solo. Los resultados son, incluso, mejores que cuando se utiliza agua sola como disolvente. Hay que hacer notar que se conoce desde hace tiempo lo problemático que es secar soluciones de compuesto tensioactivo con el resultado de quedar por lo general un residuo grumoso, tipo papilla, por lo que esta capacidad para producir un residuo uniforme, dispersable rápidamente en agua es de lo más sorprendente.

La adición de una macromolécula hidrosoluble que no interfiera con el ensayo de hemoglobina, por ejemplo, una proteína tal como albúmina (por ejemplo albúmina de suero bovino) en la producción del segundo reactivo, en forma seca o libre de disolvente se ha encontrado como especialmente beneficiosa ya que el residuo seco es más uniforme, especialmente después de un largo período de tiempo de almacenamiento. La inclusión de tal macromolécula es también beneficiosa cuando el segundo reactivo está en forma líquida ya que reduce la incidencia de precipitación del conjugado. Además de su inclusión en el primer o en el segundo reactivo, o en ambos, ha mostrado que acorta el tiempo requerido para el mezclado uniforme de los reactivos primero y segundo. Como resultado, se prefiere que uno u otro o ambos de los reactivos primero y segundo, o ambos, contengan tal compuesto macromolecular, en particular BSA, a una concentración de hasta 1% peso/volumen, especialmente 0,025 a 0,3% peso/volumen, más especialmente 0,05 a 0,1% peso/volumen.

El conjugado de ácido borónico puede, por ejemplo, ser cualquiera de los conjugados cromóforo - ácido borónico descritos en las Patentes estadounidenses US-A-5242842, US-A-5631364 y US-A-5739318; se prefiere, sin embargo, XC-DAPOL-CPBA.

El agente tensioactivo utilizado en los reactivos puede ser cualquier agente tensioactivo capaz de lisar eritrocitos, por ejemplo, desoxicolatos, Tritones y Tweens; son preferidos, sin embargo, compuestos tensioactivos no-iónicos tales como Tritons, en particular Triton X-100.

El primer reactivo puede consistir en una solución acuosa básica o puede ser soluble en agua o en una base acuosa para producir una solución acuosa básica. En el segundo caso, puede ser una solución acuosa desecada que requiere simplemente la reconstitución con agua.

El primer reactivo comprende también, preferiblemente, compuesto tensioactivo y puede contener otros componentes opcionales, por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo cloruro de sodio o magnesio y azida de sodio), glicina y compuestos tampón. El zinc se introduce preferiblemente como sal inorgánica, por ejemplo, cloruro. El disolvente primario es preferiblemente agua, pero pueden estar presentes otros disolventes miscibles con agua. El pH del reactivo es básico, preferiblemente básico débil, por ejemplo, de 7,1 a 8,5, preferiblemente 8,0 a 8,2, especialmente aproximadamente 8,1. El pH sin embargo, debe ser tal como para hacer que la mezcla del primero y segundo reactivo sea básica cuando se combinan los dos.

El primer reactivo contiene, preferiblemente, zinc 5 a 30 mM, especialmente 7 a 20 mM, y 0,05 a 0,22 peso/volumen de compuesto tensioactivo y está tamponado preferiblemente a pH 7,4 a 8,2.

El segundo reactivo, si es un líquido acuoso, contiene preferiblemente 0,15 a 0,75 mg/g, especialmente 0,20 a 0,50 mg/g de conjugado y 0,05 a 0,25% peso/volumen, especialmente 0,1 a 0,2% peso/volumen de compuesto tensioactivo, y 5 a 20% volumen/volumen, especialmente 10 a 15% volumen/volumen de disolvente orgánico miscible con agua, (por ejemplo formamida o DMSO), y si es seco está formado preferiblemente por una solución acuosa que contiene 0,1 a 0,5% mg/ml, especialmente 0,1 a 0,4 mg/ml, más especialmente 0,15 a 0,3% mg/ml de conjugado, 0,1 a 0,5% peso/volumen, especialmente 0,25 a 0,4% peso/volumen de compuesto tensioactivo, 0,2 a 0,6 mM, especialmente 0,4 a 0,55 mM de ácido (por ejemplo, ácido cítrico), hasta 70% volumen/volumen, preferiblemente 0 (por ejemplo 1% volumen/volumen y más) hasta 50% volumen/volumen de metanol, y preferiblemente 0,025 a 0,3% peso/volumen, especialmente 0,05 a 0,1%, BSA.

El reactivo de lavado es, convenientemente, un tampón acuoso, por ejemplo Hepes. Un reactivo de lavado particularmente adecuado comprende morfolina 50 mM, NaCl 200 mM, Triton X-100 al 0,5% peso/volumen, glicerina al 1% peso/volumen,  $\text{NaN}_3$  al 0,05% peso/volumen, pH 9,1.

La membrana utilizada en el kit de la invención puede ser cualquier membrana de tamaño de poro adecuado, siendo conveniente, sin embargo, un filtro de fibra de vidrio o filtro de borosilicato o una membrana celulósica, por

## ES 2 309 154 T3

ejemplo, con un “tamaño de poro” de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , especialmente 0,8  $\mu\text{m}$  a 1,0  $\mu\text{m}$ . Deseablemente, dispuesta frente a la membrana, hay una capa absorbente, por ejemplo, una capa celulósica o una capa de poliéter sulfona, sobre la superficie más alejada de la superficie de aplicación de la muestra, la que servirá para arrastrar la muestra y reactivos a través de la membrana por acción capilar.

5 En el kit de la invención, los reactivos primero y segundo (donde el segundo reactivo es líquido) se disponen preferiblemente en un recipiente de dos cámaras con una membrana frangible de separación de las cámaras. Esta puede tomar, por ejemplo, la forma de un recipiente rompible (por ejemplo de vidrio) dispuesto en el interior de un recipiente flexible. La rotura del separador de membrana frangible (por ejemplo la pared de un vial de vidrio) permite  
10 que se mezclen los dos reactivos antes de ser puestos en contacto con la muestra de sangre. Cuando el segundo reactivo es un material seco, está presente preferiblemente en el kit recubriendo la base y/o paredes de un recipiente de un recipiente o un tapón. De esta forma, el primer reactivo se puede introducir en el recipiente del segundo reactivo para que se disuelva el conjugado para el ensayo, o se puede colocar un tapón recubierto con el segundo reactivo seco en el cuello de un vial (por ejemplo un vial llenado previamente) del primer reactivo líquido. El segundo reactivo, si  
15 es líquido se puede utilizar, correspondientemente, para disolver un primer reactivo seco para utilizarlo en el ensayo.

Los recipientes de reactivo del kit tal como se suministran deberán estar, deseablemente, tapados para evitar pérdida de líquidos o introducción de humedad.

20 En otro aspecto, la invención proporciona también un método de ensayo de una mezcla de sangre en cuanto a hemoglobina glicatada, comprendiendo el citado método el contacto de una muestra de sangre con un agente tensioactivo capaz de lisar eritrocitos, un conjugado cromóforo-ácido borónico, e iones de zinc en solución acuosa, dejando incubarla muestra, haciendo pasar la muestra incubada a través de una membrana porosa capaz de retener hemoglobina precipitada, inundando la membrana para separar el conjugado que no se ha copulado a hemoglobina, midiendo  
25 el reflejo de la luz de la membrana a longitudes de onda a las que la hemoglobina y el conjugado, respectivamente, absorben luz, y comparando las intensidades de luz reflejada medidas con lo que se tiene una indicación (por ejemplo cuantitativa, semi-cuantitativa o cualitativa) de la proporción de hemoglobina en la muestra de sangre que está glicatada, caracterizado porque el citado conjugado e iones de zinc se reúnen por combinación de un primer reactivo que comprende iones zinc en solución acosa básica y un segundo reactivo que comprende un conjugado cromóforo-ácido  
30 borónico donde al menos uno de dichos reactivos primero y segundo comprende además un compuesto tensioactivo capaz de lisar eritrocitos, y donde el citado segundo reactivo, si es líquido, es ácido.

Queda claro que el kit de la invención se puede utilizar en el método de ensayo de la invención.

35 Tal como se ha mencionado antes, la combinación de compuesto tensioactivo y conjugado es soluble en agua más fácilmente que el compuesto tensioactivo o el conjugado solos. Según esto, otro aspecto de la invención proporciona un material soluble en agua producido por secado de una solución (por ejemplo una solución acuosa, alcohólica o alcohólica-acuosa) de un ácido orgánico cíclico insaturado (por ejemplo, uno que tiene un peso molecular de 500 a 1500 D, por ejemplo un conjugado de ácido borónico) y un compuesto tensioactivo (por ejemplo, un compuesto tensioactivo no iónico, especialmente un Tritón). Esta solución puede contener, naturalmente, otros solutos que asimismo se liberarán cuando el material se pone en contacto con agua.

La invención se describirá a continuación además con referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos.

45 Las condiciones de secado para el segundo reactivo en los Ejemplos 2, 5 y 6 y para el precursor en solución del Ejemplo 3 son las siguientes:

Se puede utilizar una estufa de secado al vacío o una liofilizadora con controlador de vacío programable. El aparato deberá fijarse para conseguir una presión de 7 a 10 mbar al cabo de 40-65 minutos. Las condiciones de fijación variarán dependiendo del número de tubos (cantidad de líquido) que se va a secar y el tipo de liofilizadora, Las condiciones de fijación pueden variar, según esto, para producir una película uniforme de material seco sobre las paredes de plástico.

Para una estufa de secado al vacío Heraeus (VT 6025) se han utilizado las siguientes condiciones (400-500 tubos):

55 Temperatura: 30°C  
Tiempo para obtener P2: 5 minutos  
P2: 100 mbar  
60 Tiempo de estancia en P2: 5 minutos  
Tiempo para obtener P3: 5 minutos  
65 P3: 50 mbar  
Tiempo de estancia en P3: 5 minutos

## ES 2 309 154 T3

Tiempo para obtener P4: 5 minutos

P4: 20 mbar

5 Tiempo de estancia en P4: 5 minutos

Tiempo para obtener P5: 10 minutos

10 P5: 7 mbar

Tiempo de estancia en P5: 804 minutos

15 Ejemplo 1

### *Ensayo de solución 2*

#### *Primer reactivo*

20 El primer reactivo comprende:

25	<b>Tampón Hepes</b>	<b>200 mM</b>
	<b>glicina</b>	<b>50 mM</b>
	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>18 mM</b>
	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>30 mM</b>
30	<b>NaCl</b>	<b>400 mM</b>
	<b>Triton X-100</b>	<b>0,15% peso/volumen</b>
	<b>NaN<sub>3</sub></b>	<b>0,05% peso/volumen</b>
35	<b>pH</b>	<b>8,12</b>

40 El reactivo se prepara mezclando 1 ml de Hepes 1M, 0,25 ml de glicina 1 M, 2 ml de H<sub>2</sub>O, 0,09 ml de ZnCl<sub>2</sub> 1M, 0,15 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M, 0,4 ml de NaCl 5M, 0,075 ml de Triton-X-100 al 10% y 0,025 ml de NaN<sub>3</sub> al 10%. Se ajusta el pH a 8,1 y se añade agua hasta 5 ml.

El primer reactivo se puede obtener alternativamente como sigue:

45 se disuelven 24,6 mg de cloruro de zinc en 2,5 ml de agua. Se disuelven 233,8 mg de cloruro de sodio, 61 mg de cloruro de magnesio hexahidratado, 0,05 ml de azida sódica al 10% y 0,1 ml de Triton X-100 al 10% en 2,5 ml de agua. Se combinan entonces las dos soluciones. Se disuelven 476,6 mg de Hepes y 37,6 mg de glicina en 1,5 ml de agua y 0,4 ml de hidróxido de sodio 5 M. Esta solución de Hepes se añade entonces a la solución de zinc y Triton X-100 y se ajusta el pH a 8,1 y el volumen a 10 ml.

#### *Segundo reactivo*

55 El segundo reactivo comprende:

	<b>formamida</b>	<b>al 12,4% volumen/volumen</b>
60	<b>XC-DAPOL-CPBA</b>	<b>0,32 mg/ml</b>
	<b>Triton X-100</b>	<b>0,15% peso/volumen</b>

65 El reactivo se prepara por mezclado de 0,11 ml de formamida, 0,52 ml de XC-DAPOL-CPBA (3,15 g/litro en formamida) y agua hasta 5 ml. Se puede utilizar DMSO en lugar de formamida.

## ES 2 309 154 T3

### *Procedimiento de ensayo*

Se mezclan 100  $\mu$ l del primer reactivo con 100  $\mu$ l del segundo reactivo. La mezcla se añade a 5  $\mu$ l de sangre y se deja incubar durante 2 minutos. Se coloca entonces una parte alícuota de 25  $\mu$ l en un filtro de fibra de vidrio. Se añaden 25  $\mu$ l de una solución de lavado de pH 9,1 (Ejemplo 4) y el resultado se lee sobre un lector NycoCard® a 632 y 476 nm.

### Ejemplo 2

#### 10 *Ensayo de conjugado en solución y seco*

##### *Primer reactivo*

El primer reactivo comprende:

15

**Hepes** 100 mM

**glicina** 25 mM

20

**ZnCl<sub>2</sub>** 9 mM

**MgCl<sub>2</sub>** 15 mM

**NaCl** 200 mM

25

**Triton X-100** 0,1% peso/volumen

**NaN<sub>3</sub>** 0,5% peso/volumen

30

**pH** 8,12

35

El reactivo se prepara mezclando 1 ml de Hepes 1M, 0,25 ml de glicina 1M, 2 ml de H<sub>2</sub>O, 0,09 ml de ZnCl<sub>2</sub> 1M, 0,15 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M, 0,4 ml de NaCl 5M, 0,1 ml de Triton-X-100 al 10% y 0,05 ml de NaN<sub>3</sub> al 10%. Se ajusta el pH a 8,12 y se añade agua hasta 10 ml.

40

El primer reactivo se puede obtener alternativamente como sigue: se disuelven 12,3 mg de cloruro de zinc en 2,5 ml de agua. Se disuelven 116,9 mg de cloruro de sodio, 30,5 mg de cloruro de magnesio hexahidratado, 0,05 ml de azida de sodio al 10% y 0,1 ml de Tritón X-100 al 10% en 2,5 ml de agua. Se combinan entonces las dos soluciones. Se disuelven 238,3 mg de HEPES y 18,8 mg de glicina en 1,5 ml de agua y 0,2 ml de hidróxido de sodio 5M. Esta solución de HEPES se añade entonces a la solución de zinc y Triton X-100 y el pH se ajusta a 8,1 y el volumen a 10 ml.

45

##### *Segundo reactivo*

##### *(A) Precursor en solución*

El precursor en solución comprende:

50

**Metanol** a 64,1% volumen/volumen

**XC-DAPOL-CPBA** a 0,23 mg/ml

55

**Triton X-100** a 0,336% peso/volumen

**Acido cítrico** 0,48 mM

60

El precursor en solución se prepara disolviendo XC-DAPOL-CPBA a 0,36 mg/ml en metanol. Se mezclan 2 ml de lo anterior con 105  $\mu$ l de Triton X-100 al 10%, 1 ml de agua y 15  $\mu$ l de ácido cítrico 0,1 M.

65

## ES 2 309 154 T3

### (B) Reactivo segundo

Se evaporan 150  $\mu$ l del precursor en solución.

5 El precursor en solución puede comprender alternativamente

**Metanol al 20% volumrn/volumen**

10 **XC-DAPOL-CPBA a 0,3-0,5 mg/ml**

**BSA al 0,34% peso/volumen**

**Triton X-100 al 0,336% peso/volumen**

15 **Acido cítrico 0,4-0,6 mM a pH 4,1**

20 El precursor en solución se prepara por disolución de XC-DAPOL-CPBA en metanol a 2,5 mg/ml. Se mezclan 2 ml de la solución con 4,8 ml de Triton X-100 y se añaden 2 ml de BSA al 5% peso/volumen y el pH se ajusta a 4,1 con ácido cítrico 0,1 M (unos 50-60  $\mu$ l). Se añade agua hasta un volumen de 10 ml. Se ajusta la cantidad de XC-DAPOL-CPBA utilizada para proporcionar una densidad óptica (OD) de 32,5 a 620 nm.

Se secan entonces al vacío 125  $\mu$ l de este precursor en solución para producir el segundo reactivo.

25 *Procedimiento de ensayo*

Se mezclan 200  $\mu$ l del primer reactivo con el segundo reactivo y a continuación con 5  $\mu$ l de sangre. El procedimiento de ensayo se sigue entonces como en el Ejemplo 1.

30 Ejemplo 3

*Ensayo de tampón seco y conjugado líquido*

### (A) Precursor en solución

35 El primer reactivo comprende:

**Hidrocioruro de glicinamida 50 mM**

40 **ZnCl<sub>2</sub> 10 mM**

**MgCl<sub>2</sub> 20 mM**

**NaCl 200 mM**

45 **Triton X-100 0,1% peso/volumen**

**NaN<sub>3</sub> 0,05% peso/volumen**

**pH 8,12**

50

Se disuelven en 2,5 ml de agua 13,6 mg de ZnCl<sub>2</sub>. Se disuelven 116,9 mg de NaCl, 40,6 mg de Mg Cl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0,05 ml de NaN<sub>3</sub> al 10% peso/volumen y 0,1 ml de Triton-X-100 al 10% peso/volumen en 2,5 ml de agua. Se mezclan entonces las dos soluciones. Se disuelven entonces 55,2 mg de glicinamida en 1,5 ml de agua y 0,4 ml de NaOH 5M y esta solución se añade a la solución de zinc. Se ajusta el pH a 8,1 y el volumen a 10 ml.

55

### (B) Primer reactivo

Se secan al vacío 200  $\mu$ l del precursor en solución.

60 *Segundo reactivo*

La solución que contiene BSA citada en el Ejemplo 2 como precursor en solución se utiliza en forma líquida.

65 *Procedimiento de ensayo*

Se mezclan 200  $\mu$ l del primer reactivo con el segundo reactivo y luego con 5  $\mu$ l de sangre. El procedimiento de ensayo prosigue después como en el Ejemplo 1.

## ES 2 309 154 T3

### Ejemplo 4

#### *Solución de lavado*

5 La solución de lavado comprende:

**Morfolina** 50 mM

**NaCl** 200 mM

10 **Triton X-100** 0,5% peso/volumen

**glicerina** 0,1% peso/volumen

15 **NaN<sub>3</sub>** 0,05% peso/volumen

La solución se prepara por mezclado de los componentes, ajuste a pH 9,1 y adición de agua hasta conseguir la concentración deseada.

### 20 Ejemplo 5

#### *Ensayo de conjugado en solución y seco*

25 Se preparan los materiales para el ensayo como en el Ejemplo 2, excepto en que el precursor en solución se prepara disolviendo el conjugado de ácido borónico en NaOH 0,5 mM a 0,25 mg/ml. Esto requiere 10 a 30 minutos de agitación. Se mezclan entonces 2 ml de la solución con 0,05 ml de Triton X-100 al 10% y se agita durante otros 10 minutos. El pH se reduce entonces a aproximadamente 4,5 por adición de 0,01 ml de ácido cítrico 0,1 M. El ensayo se lleva a cabo como en el Ejemplo 2.

### 30 Ejemplo 6

#### *Ensayo de conjugado seco y en solución*

35 Los materiales para el ensayo se preparan como en el Ejemplo 2 excepto en que el precursor en solución se prepara por disolución del ácido borónico en NaOH 10 mM a 2,5 mg/ml. Se mezclan 2 ml de lo anterior con 4,8 ml de Triton X-100 al 0,7% peso/volumen. Se añaden 2 ml de BSA al 0,5% peso/volumen y el pH se ajusta a 4,1 con ácido cítrico 0,1 M (50-60  $\mu$ l). Se añade agua a un volumen de 10 ml. La cantidad de conjugado utilizada se ajusta para proporcionar una densidad óptica de 32,5 a 620 nm. El ensayo se lleva a cabo como en el Ejemplo 2.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 309 154 T3

## REIVINDICACIONES

1. Un equipo (kit) de ensayo de hemoglobina glicatada, comprendiendo el citado kit:

5 una membrana porosa capaz de retener hemoglobina precipitada;

un primer reactivo que comprende iones zinc en solución acuosa básica o que comprende un compuesto de zinc soluble en agua; y

10 un segundo reactivo que comprende un conjugado cromóforo-ácido borónico donde al menos uno de los reactivos primero y segundo además comprende un compuesto tensioactivo capaz de lisar eritrocitos, siendo ácido el citado segundo reactivo, si es líquido, y el conjugado de ácido borónico y el zinc están presentes en reactivos separados en el kit de ensayo.

15 2. Un kit según la reivindicación 1 que comprende además un reactivo acuoso de lavado.

3. Un kit como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 donde el citado primer reactivo comprende iones de zinc en solución acuosa básica.

20 4. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el citado segundo reactivo contiene un compuesto tensioactivo,

5. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el citado segundo reactivo es un material seco.

25 6. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el citado segundo reactivo es líquido y los citados reactivos primero y segundo se disponen en un recipiente de dos cámaras con una membrana frangible que separa las cámaras.

30 7. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el citado primer reactivo contiene un compuesto tensioactivo.

8. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde al menos uno de los citados primero y segundo reactivos contiene albúmina.

35 9. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde uno de los citados primero y segundo reactivo está en forma líquida en un recipiente y el otro de los citados primero y segundo reactivo está en forma seca recubriendo un tapón aplicable al citado recipiente.

40 10. Un método para ensayo de una muestra de sangre en cuanto a la hemoglobina glicatada, comprendiendo el citado método poner en contacto una muestra de sangre con un compuesto tensioactivo capaz de lisar eritrocitos, un conjugado de cromóforo-ácido borónico, e iones zinc en solución acuosa, dejando incubar la muestra, haciendo pasar la muestra incubada a través de una membrana porosa capaz de retener hemoglobina precipitada, inundando la membrana para separar el conjugado no copulado a la hemoglobina, midiendo la luz reflejada desde la membrana a longitudes de onda a las que, respectivamente, la hemoglobina y el conjugado absorben luz, y comparando las  
45 intensidades luminosas reflejadas medidas, lo que proporciona indicación de la proporción de hemoglobina en la muestra de sangre que está glicatada, que se **caracteriza** porque el citado conjugado e iones zinc se reúnen por combinación de un primer reactivo que comprende iones zinc en solución acuosa básica y un segundo reactivo que comprende un conjugado cromóforo-ácido borónico donde al menos uno de los citados reactivos primero y segundo comprende además un agente tensioactivo capaz de lisar eritrocitos y donde el citado segundo reactivo es ácido, si es  
50 líquido.

55

60

65